

ZFW

PATENT

Attorney Docket No. 03806.0599-01000

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)
)
Christian Viskov et al.) Group Art Unit: 1651
)
Application No.: 10/808,791) Examiner: Deborah K. WARE
)
Filed: March 25, 2004)
)
For: METHOD FOR QUANTATIVELY) Confirmation No.: 6028
)
DETERMINING SPECIFIC)
GROUPS CONSTITUTING)
HEPARINS OR LOW)
MOLECULAR WEIGHT)
HEPARINS)

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Applicant submits herewith a certified copy of priority French Application No.
02 11724, filed September 23, 2002.

Please grant any extensions of time required to enter this response and charge
any additional required fees to our Deposit Account 06-0916.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

Dated: April 18, 2007

By: Scott M. K. Lee
Scott M. K. Lee
Registration No. 59,574
Tel. 202-408-6073
Fax. 202-408-4400



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 SEP. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE**

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260699

REMISE DES PIÈCES DATE 23 SEPT 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0211724 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 23 SEP. 2002		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Aventis Pharma S.A. Monsieur ROUSSEAU Pierrick Direction des Brevets Tri K 144 20, Avenue Raymond Aron 92165 ANTONY CEDEX	
Vos références pour ce dossier (facultatif) FRAV2002/0026			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale N° _____ Date ____/____/____ ou demande de certificat d'utilité initiale N° _____ Date ____/____/____			
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale N° _____ Date ____/____/____			
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Méthode de détermination de groupements spécifiques constituant les héparines ou les héparines de bas poids moléculaire.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		Aventis Pharma S.A.	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme à Directoire et Conseil de Surveillance	
N° SIREN		3 0 4 4 6 3 2 8 4	
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	20, Avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92160	ANTONY
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		01 55 71 71 71	
N° de télécopie (facultatif)		01 47 02 50 14	
Adresse électronique (facultatif)			



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

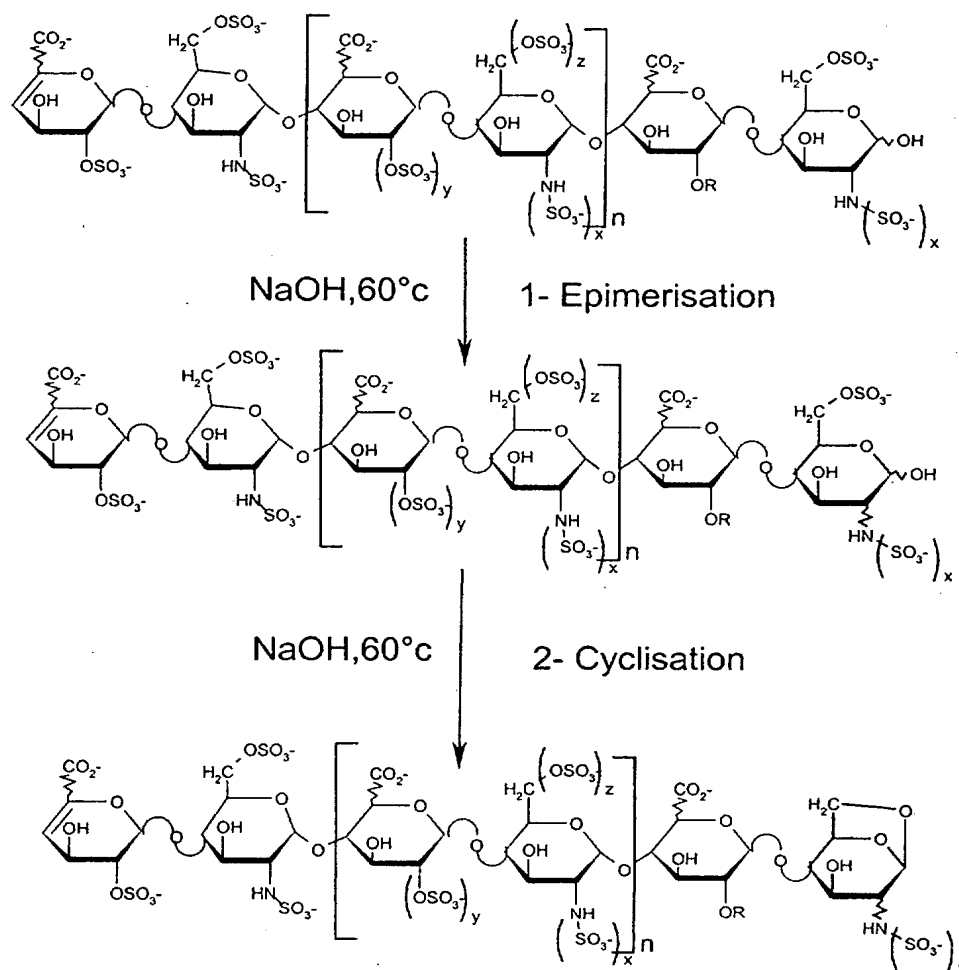
REMISE DES PIÈCES DATE 23 SEPT 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0211724 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		FRAV2002/0026	
6 MANDATAIRE			
Nom		ROUSSEAU	
Prénom		Pierrick	
Cabinet ou Société		Aventis Pharma S.A.	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	20, Avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92165	ANTONY CEDEX
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 55 71 72 85	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 55 71 72 91	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence)</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) ROUSSEAU Pierrick Mandataire		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI L. GUICHET	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

La présente invention a pour objet une méthode d'analyse de groupements spécifiques constituant les héparines ou les héparines de bas poids moléculaire.

Lors du procédé de préparation de l'Enoxaparine (Lovenox®) (US5,389,618) à partir de l'héparine pure, L'étape de procédé de dépolymérisation alcaline en phase aqueuse produit une transformation partielle mais caractéristique des glucosamines des terminaisons réductrices des chaînes oligosaccharidiques.

La première étape de cette transformation consiste en une épimerisation glucosamine \leftrightarrow mannosamine (T. Toida and al, J. Carbohydrate Chemistry, 15(3), 351-360 (1996)); la deuxième étape est une 6-O desulfatation de la glucosamine conduisant à la formation de dérivés nommés « 1,6 anhydro » (demande de brevet internationale WO01/29055).





Ce type de dérivé n'est obtenu que pour les chaînes oligosaccharidiques dont la glucosamine terminale est 6-O sulfatée.

Le pourcentage de chaînes oligosaccharidiques dont la terminaison est modifiée par une liaison 1,6-anhydro est une caractéristique structurale du mélange d'oligosaccharide du Lovenox et doit pouvoir être mesuré.

La présente invention consiste donc en une méthode d'analyse des héparines, des héparines de bas poids moléculaire et plus particulièrement du Lovenox.

La méthode d'analyse selon l'invention est la suivante :

L'échantillon à doser est dépolymérisé par action d'héparinases puis le cas échéant le dépolymérisat obtenu est réduit puis on effectue une analyse par chromatographie liquide Haute Performance.

La méthode telle que définie plus haut est donc caractérisée en ce que l'on recherche la présence de chaînes oligosaccharides dont la terminaison est modifiée par une liaison 1,6-anhydro (« Groupements 1,6 anhydro »).

En particulier, l'échantillon à doser est tout d'abord dépolymérisé de façon exhaustive par un mélange d'héparinases et notamment d'héparinase 1 (EC 4.2.2.7.), d'héparinase 2 (heparin lyase II) et d'héparinase 3 (EC4.2.2.8.). (Ces enzymes sont commercialisées par la société Grampian Enzymes).

L'invention a donc pour objet une méthode d'analyse des héparines ou des héparines de bas poids moléculaire caractérisée en ce qu'on effectue les étapes suivantes :

- 1)Dépolymérisation de l'échantillon par action d'héparinases
- 2)le cas échéant réduction du dépolymérisat
- 3)Dosage par Chromatographie liquide Haute Performance.

L'invention a plus particulièrement pour objet la méthode telle que définie plus haut caractérisée en ce que les héparinases sont sous forme d'un mélange d'héparinase 1 (EC 4.2.2.7.), d'héparinase 2 (heparin lyase II) et d'héparinase 3 (EC.4.2.2.8.)

Le dépolymérisat ainsi préparé est ensuite traité de

préférence par une solution de NaBH_4 dans l'acétate de sodium. Cette dernière opération permet de réduire spécifiquement les extrémités réductrices qui ne sont pas sous la forme 1,6 anhydro (produits décrits dans la demande de brevet WO

5 01/72762). Enfin, pour pouvoir quantifier les disaccharides 1 et 2 décrits plus bas, l'échantillon d'héparine de bas poids moléculaire, dépolymérisé par les héparinases, doit être réduit par l'action d'un agent réducteur tel que NaBH_4 .

L'invention a donc plus particulièrement pour objet la
10 méthode telle que définie plus haut caractérisée en ce que l'héparine dépolymérisée est ensuite réduite.

L'invention a tout particulièrement pour objet la méthode telle que définie précédemment caractérisée en ce que l'agent de réduction est le NaBH_4 . On pourra éventuellement
15 utiliser un autre sel de métal alcalin du borohydrure tel que le lithium ou le potassium.

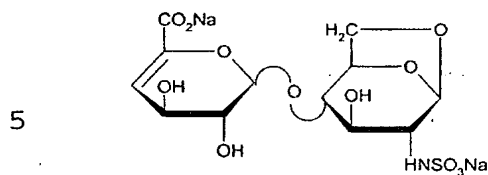
Le dosage des terminaisons 1,6 anhydro est ensuite réalisé par CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) et en particulier par chromatographie échangeuse d'anions.

20 La méthode de dosage selon l'invention permet de bien différencier le Lovenox des autres héparines de bas poids moléculaire qui ne renferment pas ces dérivés « 1,6-anhydro ». Inversement, la méthode de dosage selon l'invention permet de s'assurer que des héparines de bas
25 poids moléculaire ne remplissent pas les caractéristiques physico-chimiques du Lovenox et donc sont de nature différente.

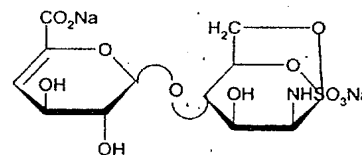
La méthode de dosage selon l'invention peut-être appliquée au procédé industriel lors des contrôles
30 d'échantillons au cours du procédé, afin d'assurer une standardisation du procédé de fabrication du Lovenox et obtenir des lots uniformes.

Après dépolymérisation enzymatique et réduction des extrémités réductrices, on trouve les dérivés 1,6-anhydro du
35 Lovenox sous 4 formes essentielles. L'invention a donc également pour objet la méthode telle que décrite précédemment caractérisée en ce que les résidus 1,6-anhydro obtenus lors de la réaction de dépolymérisation sont les

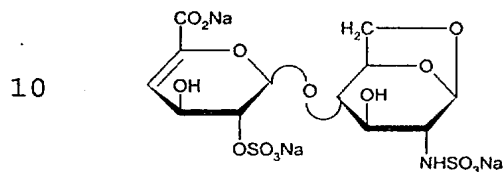
suivants :



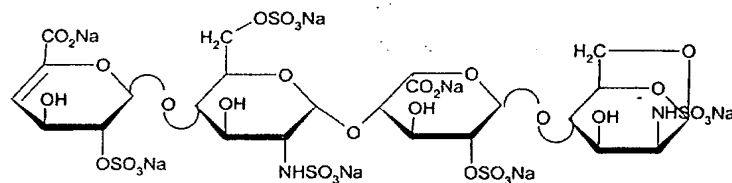
disaccharide 1



disaccharide 2



disaccharide 3

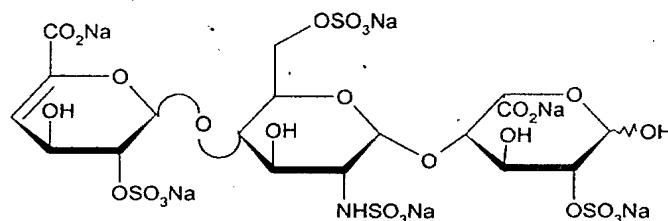


tétrasaccharide 1

15 Tous les oligosaccharides ou polysaccharides qui
comportent l'extrémité 1,6-anhydro sur l'unité
disaccharidique terminale et qui ne possèdent pas un 2-O
sulfate sur l'acide uronique, du dit disaccharide terminal,
sont totalement dépolymérisés par les héparinases et sous la
20 forme des disaccharides 1 et 2. Par contre, Lorsque le dit
saccharide terminal comporte un 2-O sulfate sur l'acide
uronique et qu'il est sous la forme mannosamine, le dérivé
1,6 anhydro se retrouve sous la forme du tétrasaccharide 1
(forme résistante aux héparinases).

25 Le trisaccharide 1 (voir plus bas), est également
présent dans le mélange. Il est issu d'un autre processus de
dégradation qui conduit à la structure ci-après (phénomène de
peeling observé dans lors de la dépolymérisation chimique du
Lovenox.

30



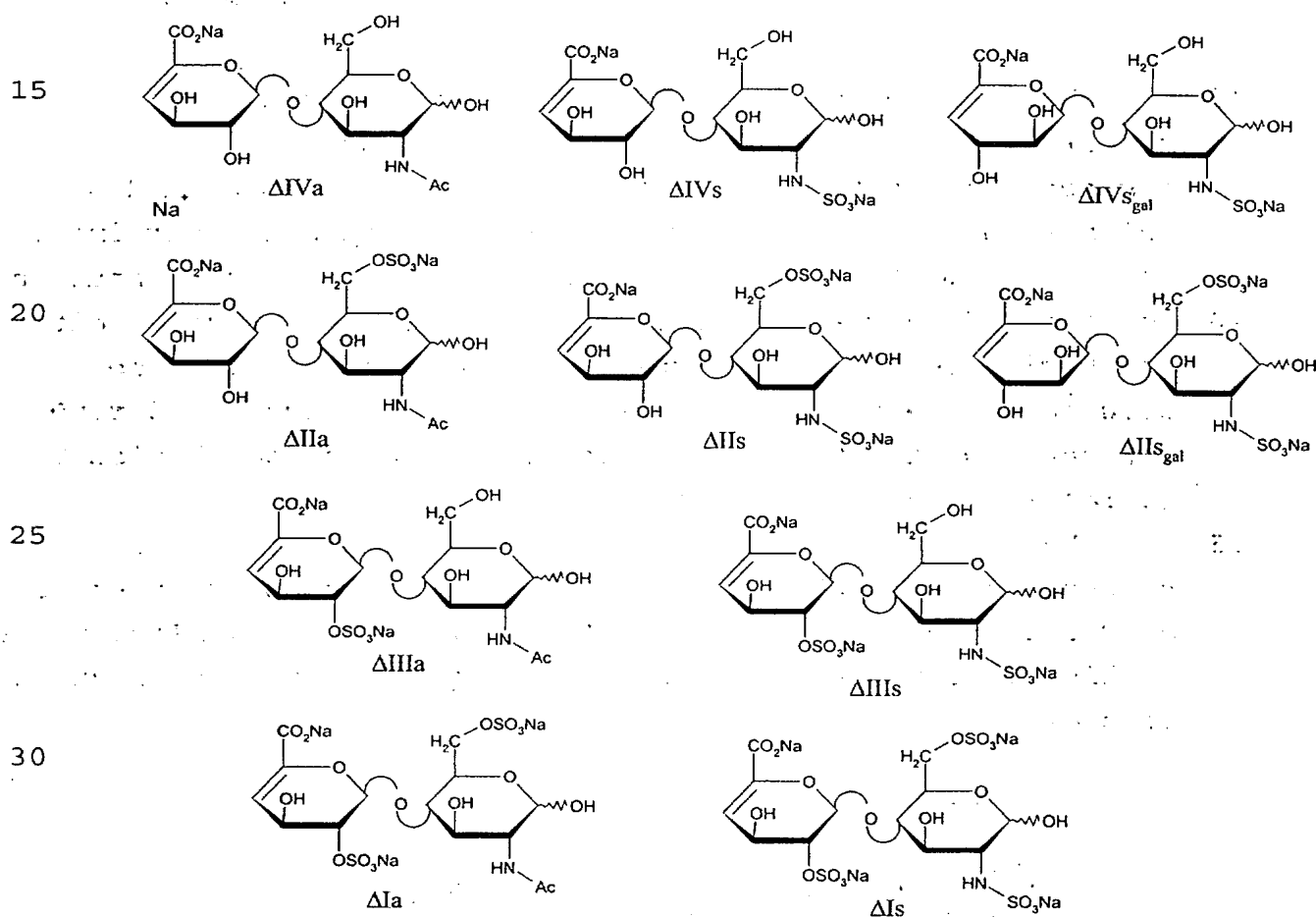
35

trisaccharide 1

Les autres constituants du mélange ne sont pas

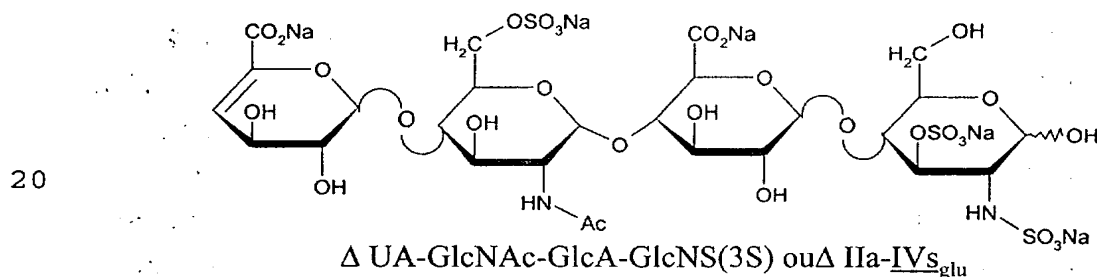
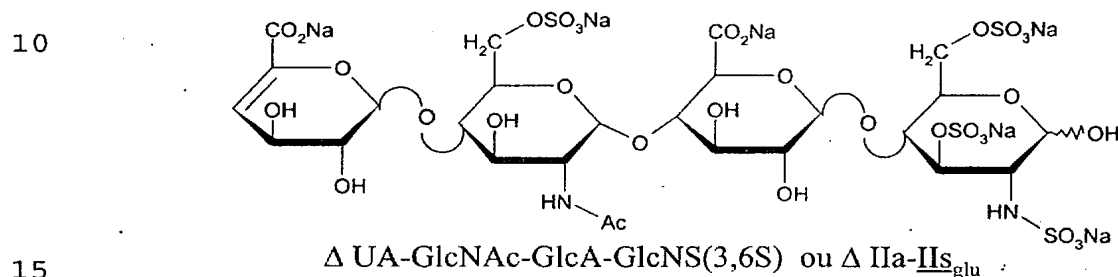
caractéristiques uniquement du Lovenox. On trouve bien entendu les 8 disaccharides élémentaires de la chaîne héparinique. Ces 8 disaccharides élémentaires sont commercialisés entre autre par la société Sigma.

5 D'autres disaccharides ont été identifiés dans le mélange par la méthode selon l'invention: les disaccharides $\Delta\text{IIs}_{\text{gal}}$ et $\Delta\text{IVs}_{\text{gal}}$ qui ont pour origine la 2-0 desulfatation alcaline de -IdoA(2S)-GlcNS(6S)- et de -IdoA(2S)-GlcNS- conduisant à la formation de 2 acides galacturoniques. Il ne
10 sont pas habituellement présents dans la structure originelle de l'héparine (U.M. Desai et Coll. Arch. Biochem. Biophys., 306 (2) 461-468 (1993).

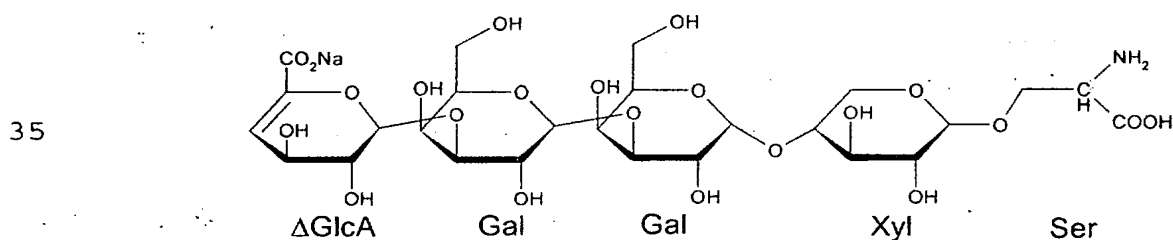


Les oligosaccharides comportant des glucosamines 3-0 sulfatés résistent au clivage par les héparinases et restent présents sous forme de tétrasaccharides.

Dans le cas de la plupart des héparines de bas poids moléculaire, l'héparine est extraite du mucus de porc, et ces tétrasaccharides principaux sont représentés plus bas. Ils sont résistants à la dépolymérisation enzymatique et sont le reflet des séquences affines à l'antithrombine III. Ils sont symbolisés ainsi : Δ Ila-IIs_{glu} et Δ Ila-IVs_{glu}. (S.YAMADA, K.YOSHIDA, M. SUGIURA, K.SUGAHARA, K-H KHOO, H.R. MORRIS, A. DELL, J.Biol.Chem. ; 270(7), 4780-4787 (1993)



25 Le dernier constituant du mélange clivé par les héparinases est la terminaison glycosérine Δ GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser (K.SUGAHARA, H.TSUDA, K.YOSHIDA, S.YAMADA, J.Biol.Chem. ; 270(39), 22914-22923 (1995) ; K.SUGAHARA, S.YAMADA, K.YOSHIDA, P. de WAARD, J.F.G. Vliegenthart ; J.Biol.Chem. ; 267(3), 1528-1533 (1992). Ce dernier est généralement presque absent du Lovenox (Voir RMN à l'exemple 5).



Un autre aspect de l'invention se situe au niveau du procédé de chromatographie utilisé pour la détermination des groupements 1,6-anhydro. Tout d'abord il s'agit de séparer les différents polysaccharides obtenus après dépolymérisation et traitement par un agent réducteur tel que le NaBH_4 .

La chromatographie d'échange d'anions (SAX) est la méthode séparative la plus adaptée à un tel mélange complexe.

Les colonnes remplies d'une phase stationnaire du type Spherisorb SAX de granulométrie $5\text{ }\mu\text{m}$ et d'une longueur de 25 cm peuvent être utilisées. Tous les diamètres de colonne classiques, compris entre 1mm et 4.6 mm sont utilisables.

L'appareillage utilisé peut-être un chromatographe permettant la formation de gradient d'élution avec un détecteur UV, plus préférentiellement muni d'une barrette de diodes afin de pouvoir réaliser des spectres UV des constituants et d'enregistrer des signaux complexes, résultant de la différence entre les absorbances à 2 longueurs d'ondes différentes et permettant la détection spécifiques des oligosaccharides acétylés. Pour permettre ce type de détection, des phases mobiles transparentes dans l'UV jusqu'à 200 nm sont préférables. Ceci exclut les phases mobiles classiques à base de NaCl qui ont par ailleurs l'inconvénient de nécessiter un chromatogramme passivé afin de résister au pouvoir corrosif des chlorures. La phase mobile utilisée ici sera de préférence à base de perchlorate de sodium, mais les sels de méthane sulfonate ou phosphate peuvent aussi être utilisés.

Le pH préconisé pour la séparation est de 2 à 6,5. Préférentiellement, on utilisera un pH voisin de 3. Il est contrôlé ici par addition d'un sel tel que le phosphate possédant un pouvoir tampon à $\text{pH} = 3$ meilleur que celui des perchlorates.

A titre d'exemple, on donne ci-après des conditions standard de séparation chromatographique :

Solvant A : NaH_2PO_4 2,5mM porté à pH 2,9 par addition de H_3PO_4

Solvant B : NaClO_4 1N- NaH_2PO_4 2,5mM porté à pH 3,0 par addition de H_3PO_4



Le gradient d'élution peut être le suivant :

T=0min : %B = 3 ; T= 40 min: %B = 60 ; T = 60 min :
%B = 80

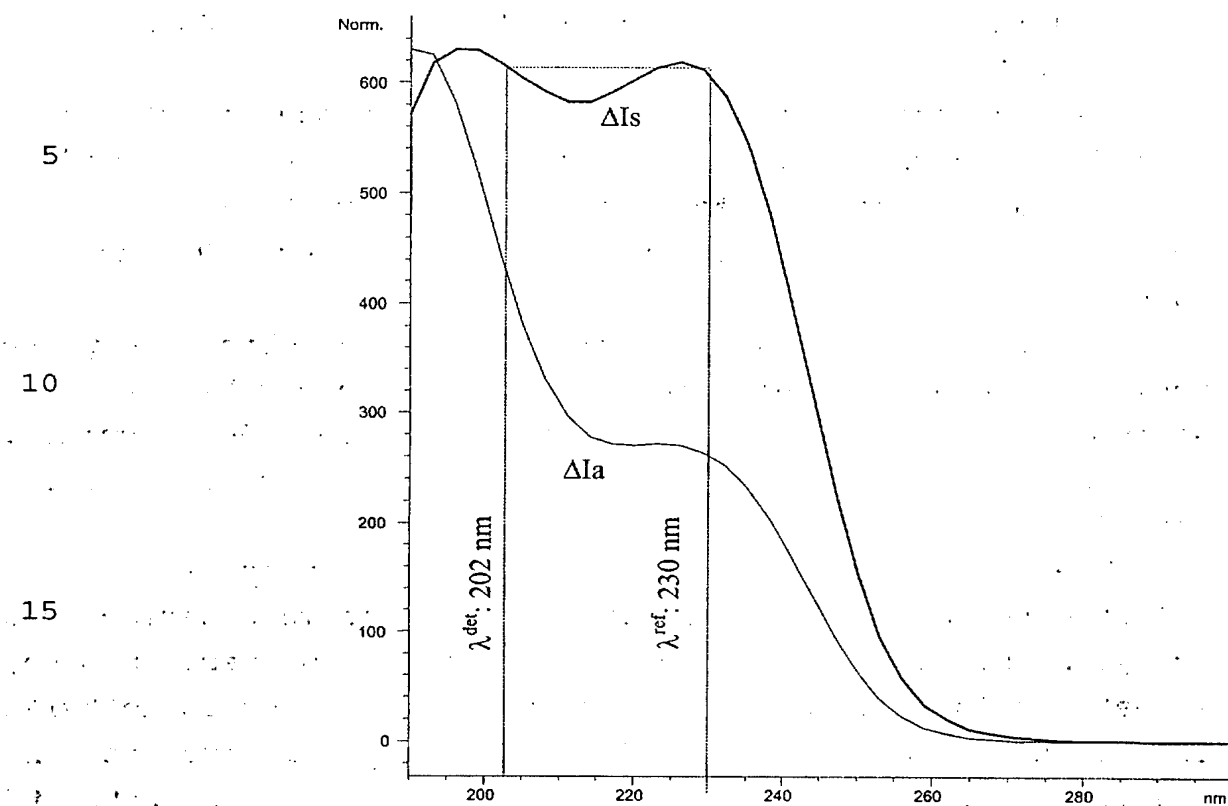
La présente invention a donc également pour objet une
5 méthode d'analyse telle que définie plus haut par séparation
par chromatographie par échange d'anions caractérisée en ce
qu'on utilise la phase mobile transparente dans l'UV jusqu'à
200nm.

L'invention a plus particulièrement pour objet une phase
10 mobile telle que définie plus haut à base de perchlorate de
sodium, de sels de méthane sulfonate ou de sels de phosphate.

Un autre aspect tout à fait important se trouve dans la
méthode de détection.

Une méthode a été développée afin d'accroître la
15 spécificité de la détection UV. Comme les polysaccharides non
acétylés ont tous, à un pH donné, un spectre UV assez proche,
il est possible de détecter sélectivement les sucres acétylés
en prenant comme signal la différence entre l'absorbance à 2
longueurs d'onde choisies de telle manière que l'absorptivité
20 des saccharides non acétylés s'annule.

Dans le cas ci-dessous, on choisira 202 nm et 230 nm
comme longueurs d'onde de détection et de référence et l'on
notera le signal 202 - 230 nm. Le détecteur le plus adapté à
cette technique est le détecteur DAD 1100 de la société
25 Agilent Technologies. Dans ce cas, une double détection sera
réalisée à 234 nm d'une part, et à 202-230 nm d'autre part.
Le principe de détection sélective des oligosaccharides
acétylés est illustré sur la figure ci-dessous dans laquelle
le spectre UV d'un disaccharide sulfaté Delta 1s est comparé
30 avec celui d'un disaccharide acétylé Delta 1a



La présente invention a donc également pour objet une méthode d'analyse telle que définie plus haut par séparation par chromatographie par échange d'anions caractérisée en ce que la méthode de détection permet de détecter sélectivement les sucres acétylés.

L'invention a également tout particulièrement pour objet une méthode d'analyse telle que définie plus haut par séparation par chromatographie par échange caractérisée en ce que la détection sélective des sucres acétylés s'effectue en prenant comme signal la différence entre l'absorbance à 2 longueurs d'onde choisies de telle manière que l'absorptivité des saccharides non acétylés s'annule.

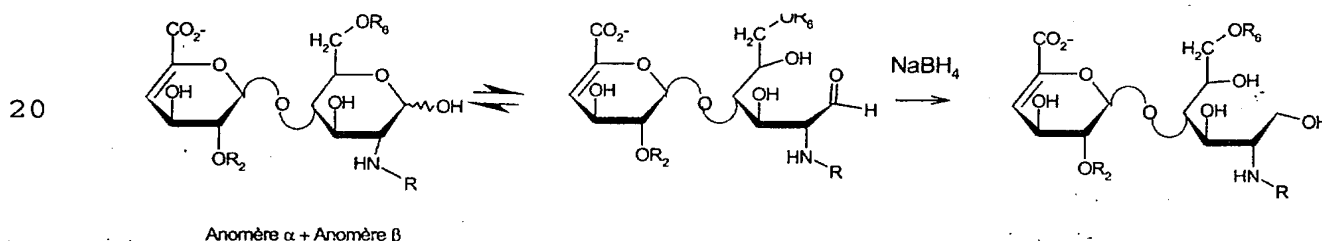
La quantification des 4 résidus 1,6-anhydro décrits plus haut nécessite une sélectivité suffisante du système chromatographique vis à vis de tous les autres constituants du mélange. Or, les 2 disaccharides 1 et 2, en général co-élus, sont mal résolus par rapport à ΔI_{IIa} , surtout que ce dernier est présent sous la forme de ses 2 anomères α et β .



L'identité des 2 disaccharides 1 et 2 peut être facilement vérifiée car ils se forment en quelques heures à température ambiante dans une solution aqueuse de Δ IIs portée à pH 13 par addition de NaOH. Cependant, si la double
 5 détection est utilisée, les oligosaccharides acétylés Δ IVa, Δ IIa, Δ IIIa, Δ Ia, Δ IIa-IVS_{glu} et Δ IIa-IIS_{glu} sont facilement identifiables.

Les causes de dédoublement des pics sont les formes anomères d'une part, et dans une moindre mesure
 10 l'épimérisation glucosamine \leftrightarrow mannosamine présente partiellement pour Δ IIs, Δ IIIs et Δ Is lorsqu'ils sont en position terminale dans la chaîne oligosaccharidique.

Pour pouvoir quantifier les disaccharides 1 et 2, l'échantillon d'héparine de bas poids moléculaire,
 15 dépolymérisé par les héparinases, est réduit par l'action NaBH_4 .



25 Cette réduction a pour avantage de supprimer les anoméries $\alpha \leftrightarrow \beta$ par ouverture du cycle oligosaccharidique terminal. Le chromatogramme obtenu est plus simple puisque les anoméries sont supprimées et surtout la réduction de Δ IIa diminue sa rétention sur la colonne et permet un dosage
 30 facile des disaccharides 1 et 2.

Les exemples de chromatogrammes décrits dans les figures 1 et 2 ci-après illustrent bien ces phénomènes et les avantages de cette méthode.

Enfin, l'invention a également pour objet les dérivés
 35 saccharidiques nouveaux obtenus par la mise en œuvre du procédé de dépolymérisation et de réduction choisis parmi le disaccharide 1, le disaccharide 2, le disaccharide 3 et le Trisaccharide 1.

Les exemples ci-dessous illustrent l'invention sans toutefois avoir un caractère limitatif

Exemple 1 :

La dépolymérisation enzymatique est réalisée pendant 5 48 heures à température ambiante en mélangeant 50 μ l d'une solution à 20 mg/ml de l'héparine de bas poids moléculaire à doser, 200 μ l d'une solution 100mM acide acétique/NaOH à pH 7.0 contenant 2 mM d'acétate de calcium et 1 mg/ml de BSA avec 50 μ l de la solution mère des 3 héparinases.

10 La réduction est réalisée sur 60 μ l du produit dépolymérisé par les héparinases en rajoutant 10 μ l d'une solution de NaBH₄ à 30 g/l dans l'acétate de sodium 100 mM préparée extemporanément. On notera que les héparinases sont conservées à - 30°C. Les héparinases sont en solution tampon 15 et leur titre est de 0.5 UI/ml (Composition de la solution tampon : solution aqueuse pH 7 de KH₂PO₄ à une concentration 0.01 mole/l et additionnée de sérum d'albumine bovine (BSA) à 2 mg/ml).

20 **Exemple 2 :**

RMN du Disaccharide 3 obtenu selon le procédé décrit plus haut

Spectre proton dans D₂O, 400 MHz, T=298K, δ en ppm: 3,34 (1H, dd, J=7 et 2Hz, H2), 3,72 (1H, t, J=8Hz, H6), 3,90 (1H, 25 m, H3), 4,03 (1H, s, H4), 4,20 (1H, d, J=8Hz, H6), 4,23 (1H, t, J=5Hz, H3'), 4,58 (1H, m, H2'), 4,78 (1H, m, H5), 5,50 (1H, s, H1), 5,60 (1H, dd, J=6 et 1Hz, H1'), 6,03 (1H, d, J=5Hz, H4')].

30 **Exemple 3**

RMN du Tetrasaccharide 1 obtenu selon le procédé décrit plus haut.

Spectre proton dans D₂O, 400 MHz, T=298K, δ en ppm: 3,15 (1H, s, H2), 3,25 (1H, m, H2'), 3,60 (1H, m, H3'), entre 35 3,70 et 4,70 (14H, massif, H3/H4/H6, H2'/H3'/H4'/H5', H4''/H5''/H6'', H2'''/H3'''), 4,75 (1H, m, H5), entre 5,20 et 5,40 (2H, m, H1' et H1''), 5,45 (1H, m, H1'''), 5,56 (1H, m, H1), 5,94 (1H, d, J=5Hz, H4)

**Exemple 4 :**

RMN du Trisaccharide 1 obtenu selon le procédé décrit plus haut.

Spectre dans D₂O, 600 MHz (δ en ppm): 3,28 (1H, m), 3,61 (1H, t, 7Hz), 3,79 (1H, t, 7Hz), 3,95 (1H, d, 6Hz), 4,00 (1H, s), 4,20 (1H, m), 4,28 (2H, m), 4,32 (1H, d, 4Hz), 4,41 (1H, s), 4,58 (1H, s), 4,61 (1H, s), 4,90 (1H, s large), 5,24 (1H, s), 5,45 (1H, s), 5,95 (1H, s).

Exemple 5 :

RMN du Δ GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser

Spectre dans D₂O, 500 MHz (δ en ppm): 3,30 (1H, t, 7Hz), 3,34 (1H, t, 8Hz), 3,55 (1H, t, 7Hz), 3,60 (1H, t, 7Hz), entre 3,63 et 3,85 (10H, m), 3,91 (2H, m), 3,96 (1H, dd, 7 et 2Hz), entre 4,02 et 4,10 (3H, m), 4,12 (1H, d, 2Hz), 4,18 (1H, m), 4,40 (1H, d, 6Hz), 4,46 (1H, d, 6Hz), 4,61 (1H, d, 6Hz), 5,29 (1H, d, 3Hz), 5,85 (1H, d, 3Hz).

Exemple 6 : Principe de la quantification

Dans la méthode selon l'invention, il est fait comme hypothèse, largement admise, que tous les oligosaccharides insaturés contenus dans le mélange ont la même absorptivité molaire, égale à 5500 mole⁻¹.l.cm⁻¹.

Il est donc possible de déterminer le pourcentage en poids de tous les constituants du mélange dépolymérisé dans l'héparine de bas poids moléculaire de départ. Pour les 4 dérivés 1,6 anhydro qui correspondent aux pics 7,8,13 et 19, on obtient les pourcentages en poids suivants:

$$\% w/w_{7+8} = 100 \cdot \frac{443 \cdot (Area_7 + Area_8)}{\sum Mw_x \cdot Area_x} ;$$

$$\% w/w_{13} = 100 \cdot \frac{545 \cdot Area_{13}}{\sum Mw_x \cdot Area_x}$$

$$\% w/w_{19} = 100 \cdot \frac{1210 \cdot Area_{13}}{\sum Mw_x \cdot Area_x}$$

Area₇, Area₈, Area₁₃ et Area₁₉ correspondent aux aires de chacun des pics 7, 8, 13 et 19. Les masses molaires de chacun de ces 4 composés sont respectivement 443, 443, 545 et 1210. $\sum Mw_x \cdot Area_x$ correspond au rapport de l'aire de chaque pic du chromatogramme par la masse molaire du produit correspondant.

Si M_w est la masse moyenne de l'héparine de bas poids moléculaire étudiée, le pourcentage de chaînes oligosaccharidiques se terminant par un cycle 1,6 anhydro est obtenu de la façon suivante :

$$\%_{1,6anhydro} = M_w \cdot \left(\frac{\% w/w_{7+8}}{443} + \frac{\% w/w_{13}}{545} + \frac{\% w/w_{19}}{1210} \right)$$

Les masses moléculaires des constituants sont les suivantes :

Oligosacchari de	Oligosacchari de après réduction	Masse moléculaire
1	1	741
2	20	401
3	3	734
4	21	461
5	22	461
6	23	503
7	7	443
8	8	443
9	24	503
10	25	563
11	26	563
12	27	563
13	13	545
14	28	605
15	29	1066
16	30	665
17	31	965
18	32	1168
19	19	1210



Nomenclature des saccharides et correspondance avec les
pics selon les figures 1 et 2

- IdoA : acide α -L-Idopyranosyluronique;
- 5 GlcA : : acide β -D-Glucopyranosyluronique;
- Δ GlcA : acide 4,5-insaturaté : acide 4-déoxy- α -L-*threo*-hex-4-enepyransyluronique
- Gal : D-Galactose ;
- Xyl : xylose ;
- 10 GlcNAc : 2-deoxy-2-acetamido- α -D-glucopyranose;
- GlcNS : 2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranose;
- 2S : 2-O sulfate ,
- 3S : 3-O sulfate ,
- 6S : 6-O sulfate
- 15 1 : Δ GlcA β 1-3 Gal β 1-3 Gal β 1-4 Xyl β 1-O-Ser
- 2 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-enepyransyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido- α -D-glucopyranosyl sel de sodium
- 3 : Δ GlcA β 1-3 Gal β 1-3 Gal β 1-4 Xyl β 1-O-CH₂-COOH
- 4 : acide 4-deoxy- α -L-*threo*-hex-4-enegalactopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-glucopyranose sel de disodium
- 20 5 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-enepyransyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl sel de disodium
- 25 6 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-enepyransyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl sel de disodium
- 7 : acide 4-deoxy- α -L-*threo*-hex-4-enepyransyluronique-(1 \rightarrow 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-glucopyranose sel de disodium (disaccharide 1)
- 30 8 : acide 4-deoxy- α -L-*threo*-hex-4-enepyransyluronique-(1 \rightarrow 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-mannopyranose sel de disodium (Disaccharide 2)
- 9 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-enepyransyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido- α -D-glucopyranosyl sel de disodium
- 35 10 : acide 4-deoxy- α -L-*threo*-hex-4-enegalactopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- β -D-

glucopyranose sel de triisodium

11 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-enepyranosyluronique-
(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl sel
de trisodium

5 12 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-enepyrano-
syluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl
sel de trisodium

13 : acide 4-deoxy-2-O-sulfo- α -L-threo-hex-4-enepyrano-
syluronique-(1 \rightarrow 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-
10 glucopyranose sel de trisodium (Disaccharide 3)

14 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-enepyrano-
syluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-
glucopyranosyl sel de trisodium

15 : acide 4-désoxy - α -L-thréo-hex-enepyranosyluronique-
15 (1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-
(1 \rightarrow 4)-acide β -D-glucopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-
sulfamido-3-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl) sel de pentasodium

16 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-enepyrano-
syluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-
20 glucopyranosyl sel de tétrasodium

17 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-enepyranosyluronique-
(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-
(1 \rightarrow 4)-acide β -D-glucopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-
sulfamido-3,6-di-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl) sel d'hexasodium
25 18 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-
enepyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo-D-
glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-acide-2-O-sulfo α -L-idopyrano-
syluronique sel d'hexasodium

19 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-enepyrano-
30 syluronique-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-
glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-acide-2-O-sulfo α -L-idopyrano-
syluronique-(1 \rightarrow 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfamido- β -D-
mannopyranose, sel de heptasodium (tetrasaccharide 1)

20 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-enepyranosyluronique-
35 (1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido- α -D-glucitol sel de sodium

21 : acide 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-enegalactopyrano-
syluronique-(1 \rightarrow 4)- 2-deoxy-2-sulfamido- β -D-glucitol sel de
disodium



- 22 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronic-
(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido- α -D-glucitol sel de disodium
- 23 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronic-
(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol sel de
5 disodium
- 24 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronic-
(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido- α -D-glucitol sel de
disodium
- 25 : acide 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-ene-galactopyranosyluronic-
10 syluronic-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- β -D-glucitol sel de triisodium
- 26 : acide 4-désoxy- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronic-
(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol sel de
trisodium
- 15 27 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronic-
(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido- α -D-glucitol sel de
trisodium
- 28 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronic-
(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol sel de trisodium
20
- 29 : acide 4-désoxy - α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronic-
(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-
acide β -D-glucopyranosyluronic-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-3-O-sulfo- α -D-glucitol) sel de pentasodium
- 25 30 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronic-
(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucitol sel de tétrasodium
- 31 : acide 4-désoxy - α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronic-
(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-acétamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-
30 (1 \rightarrow 4)-acide β -D-glucopyranosyluronic-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo- α -D-glucitol) sel d'hexasodium
- 32 : acide 4-désoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-ene-pyranosyluronic-
(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-acide -2-O-sulfo- α -L-idopyranosyluronic sel d'hexasodium (forme réduite par
35 NaBH₄).

REVENDEICATIONS

1) Méthode d'analyse des héparines ou des héparines de bas poids moléculaire caractérisée en ce qu'on effectue les étapes suivantes :

- 5 1 - Dépolymérisation de l'échantillon par action d'héparinases
- 2 - le cas échéant réduction du dépolymérisat
- 3 - Dosage par Chromatographie liquide Haute Performance.

10 2) Méthode telle que définie à la revendication 1 caractérisée en ce que l'on recherche la présence de chaînes oligosaccharides dont la terminaison est modifiée par une liaison 1,6-anhydro.

15 3) Méthode telle que définie à la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que les héparinases sont sous forme d'un mélange d'héparinase 1 (EC 4.2.2.7.), d'héparinase 2 (heparin lyase II) et d'héparinase 3 (EC.4.2.2.8.)

20 4) Méthode telle que définie à la revendication 1 caractérisée en ce que l'héparine dépolymérisée par action d'héparinase (dépolymérisat) est ensuite soumise à un agent de réduction.

25 5) Méthode telle que définie à la revendication 4 caractérisée en ce que l'agent de réduction est le NaBH_4 ou un sel de métal alcalin de l'anion borohydrure.

30 6) Méthode telle que définie à la revendication 1 dans laquelle la méthode chromatographique utilisée est une chromatographie par échange d'anion.

35 7) Méthode telle que définie à la revendication 6 caractérisée en ce que l'on utilise une phase mobile transparente dans l'UV jusqu'à 200 nm.

8) Méthode telle que définie à la revendication 6 ou 7 caractérisée en ce que la phase mobile utilisée est à base de

**REVENDECATIONS**

1) Méthode d'analyse des héparines ou des héparines de bas poids moléculaire caractérisée en ce qu'on effectue les étapes suivantes :

1 - Dépolymérisation de l'échantillon par action d'héparinases

2 - le cas échéant réduction du dépolymérisat

3 - Dosage par Chromatographie liquide Haute Performance.

2) Méthode telle que définie à la revendication 1 caractérisée en ce que l'on recherche la présence de chaînes oligosaccharides dont la terminaison est modifiée par une liaison 1,6-anhydro.

3) Méthode telle que définie à la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que les héparinases sont sous forme d'un mélange d'héparinase 1 (EC 4.2.2.7.), d'héparinase 2 (heparin lyase II) et d'héparinase 3 (EC.4.2.2.8.)

4) Méthode telle que définie à la revendication 1 caractérisée en ce que l'héparine dépolymérisée par action d'héparinase (dépolymérisat) est ensuite soumise à un agent de réduction.

5) Méthode telle que définie à la revendication 4 caractérisée en ce que l'agent de réduction est le NaBH_4 ou un sel de métal alcalin de l'anion borohydrure.

6) Méthode telle que définie à la revendication 1 dans laquelle la méthode chromatographique utilisée est une chromatographie par échange d'anion.

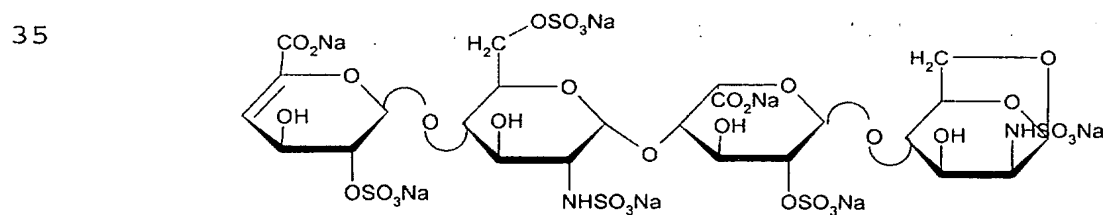
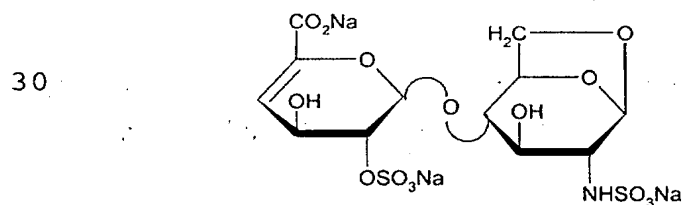
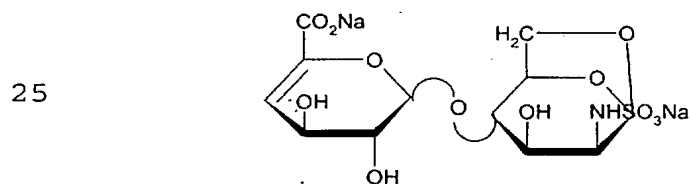
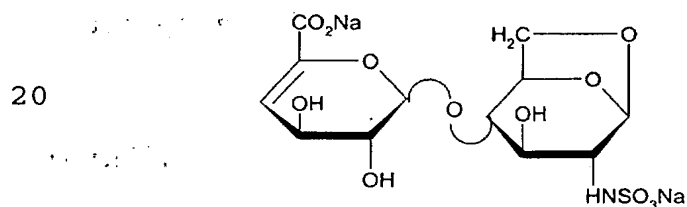
7) Méthode telle que définie à la revendication 6 caractérisée en ce que l'on utilise une phase mobile transparente dans l'UV jusqu'à 200 nm.

8) Méthode telle que définie à la revendication 6 ou 7 caractérisée en ce que la phase mobile utilisée est à base de perchlorate de sodium, les sels de méthane sulfonate ou les sels de phosphate.

9) Méthode telle que définie à la revendication 6 caractérisée en ce qu'on utilise une méthode de détection permettant de détecter sélectivement les sucres acétylés.

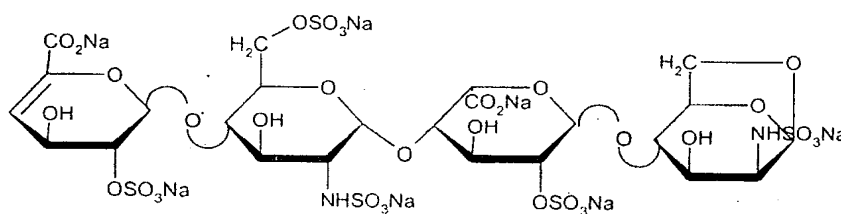
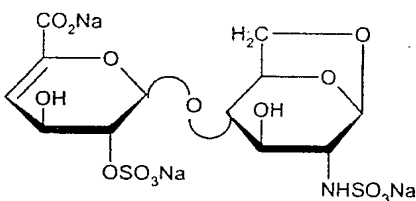
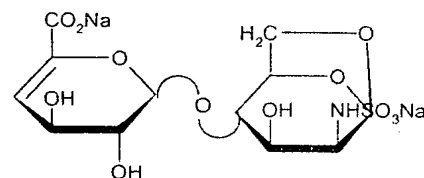
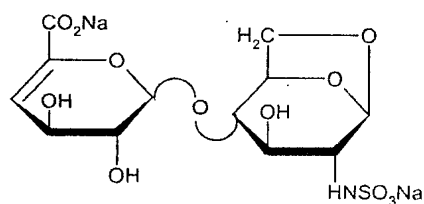
perchlorate de sodium, les sels de méthane sulfonate ou les sels de phosphate.

- 9) Méthode telle que définie à la revendication 6
 5 caractérisée en ce qu'on utilise une méthode de détection permettant de détecter sélectivement les sucres acétylés.
- 10) Méthode telle que définie à la revendication 9
 10 caractérisée en ce que la détection sélective des sucres acétylés s'effectue en prenant comme signal la différence entre l'absorbance à 2 longueurs d'onde choisies de telle manière que l'absorptivité des saccharides non acétylés s'annule.
- 15 11) Méthode selon la revendication 1 caractérisée en ce que les résidus 1-6 anhydro obtenus lors de la réaction de dépolymérisation sont les suivants :



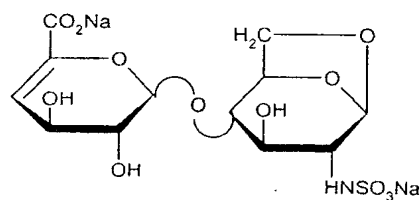
10) Méthode telle que définie à la revendication 9 caractérisée en ce que la détection sélective des sucres acétylés s'effectue en prenant comme signal la différence entre l'absorbance à 2 longueurs d'onde choisies de telle manière que l'absorptivité des saccharides non acétylés s'annule.

11) Méthode selon la revendication 1 caractérisée en ce que les résidus 1-6 anhydro obtenus lors de la réaction de dépolymérisation sont les suivants :



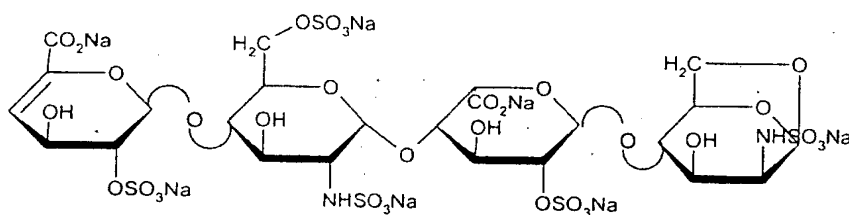
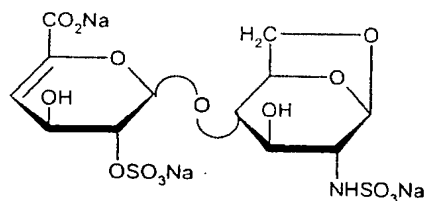
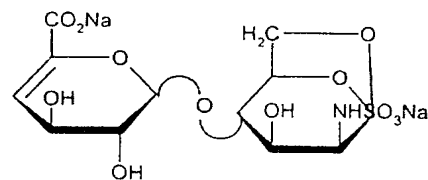
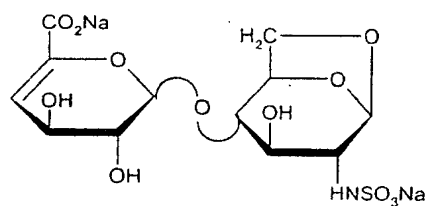
12)
anhydro
(disaccharide 1)

Dérivé 1, 6
de formule



10) Méthode telle que définie à la revendication 9 caractérisée en ce que la détection sélective des sucres acétylés s'effectue en prenant comme signal la différence entre l'absorbance à 2 longueurs d'onde choisies de telle manière que l'absorptivité des saccharides non acétylés s'annule.

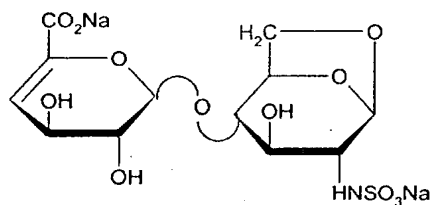
11) Méthode selon la revendication 1 caractérisée en ce que les résidus 1-6 anhydro obtenus lors de la réaction de dépolymérisation sont les suivants :



21

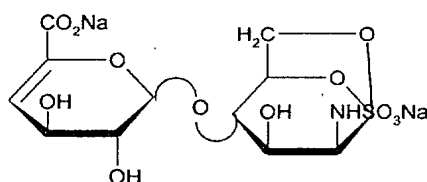
12) Dérivé 1, 6 anhydro de formule (disaccharide 1)

5



13) Dérivé 1,6 anhydro de formule (Disaccharide 2)

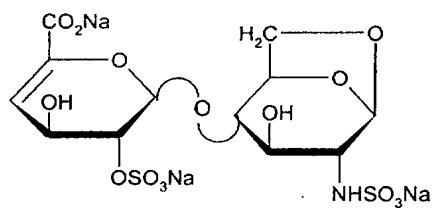
10



15

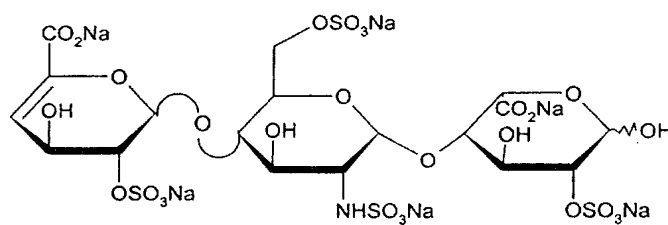
14) Dérivé 1,6 anhydro de formule (Disaccharide 3)

20



15) Dérivé trisaccharide de formule :

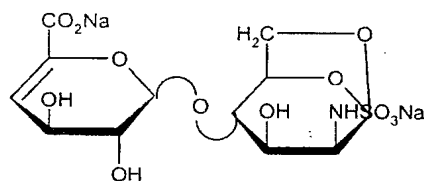
25



30

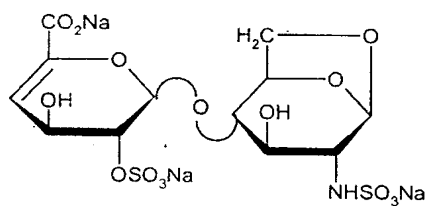
telle que définie à la revendication 11.

13) Dérivé 1,6 anhydro de formule (Disaccharide 2)



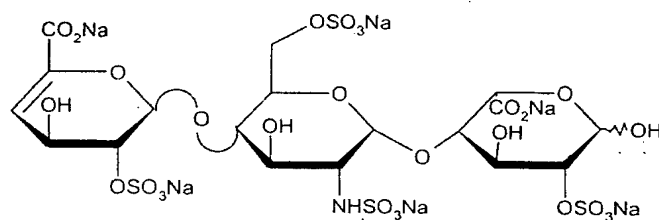
telle que définie à la revendication 11.

14) Dérivé 1,6 anhydro de formule (Disaccharide 3)



telle que définie à la revendication 11.

15) Dérivé trisaccharide de formule :



telle que définie à la revendication 11.

17

Figure 1

Séparation chromatographique de l'Enoxaparine
dépolymérisée par les héparinases avant et après réduction
par NaBH_4 (Signal en noir fin : UV à 234nm ; Signal en noir
5 épais UV : 202 - 230nm)

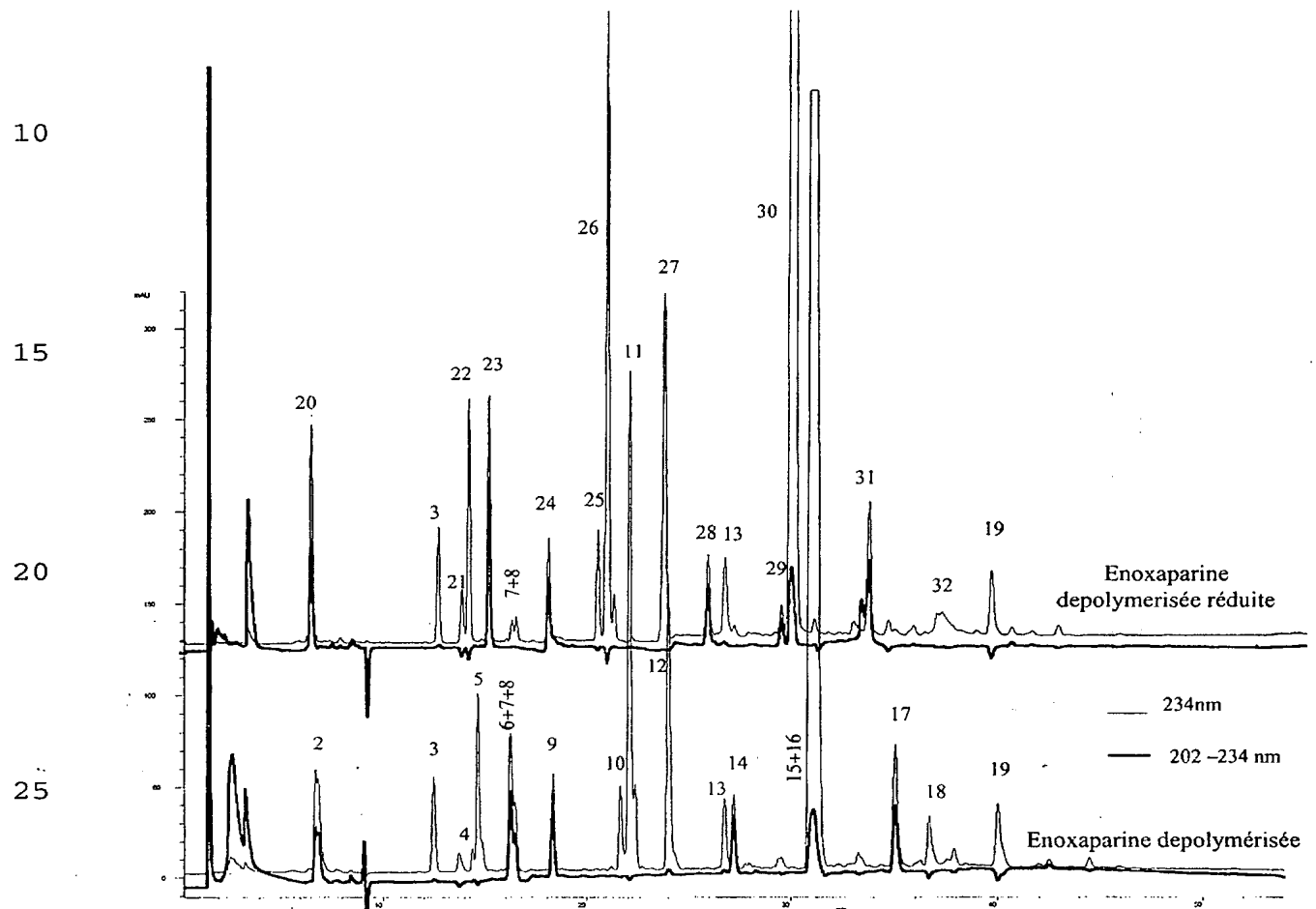
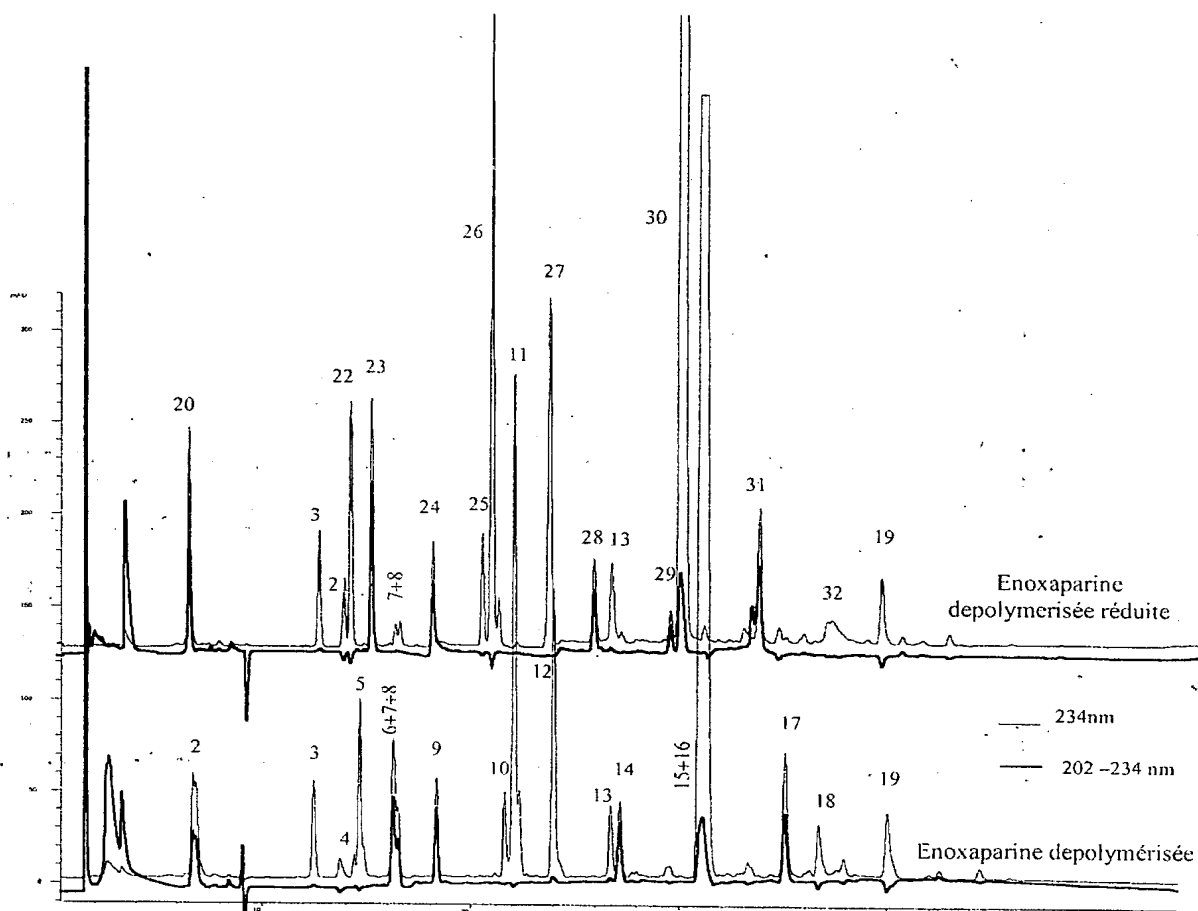


Figure 1

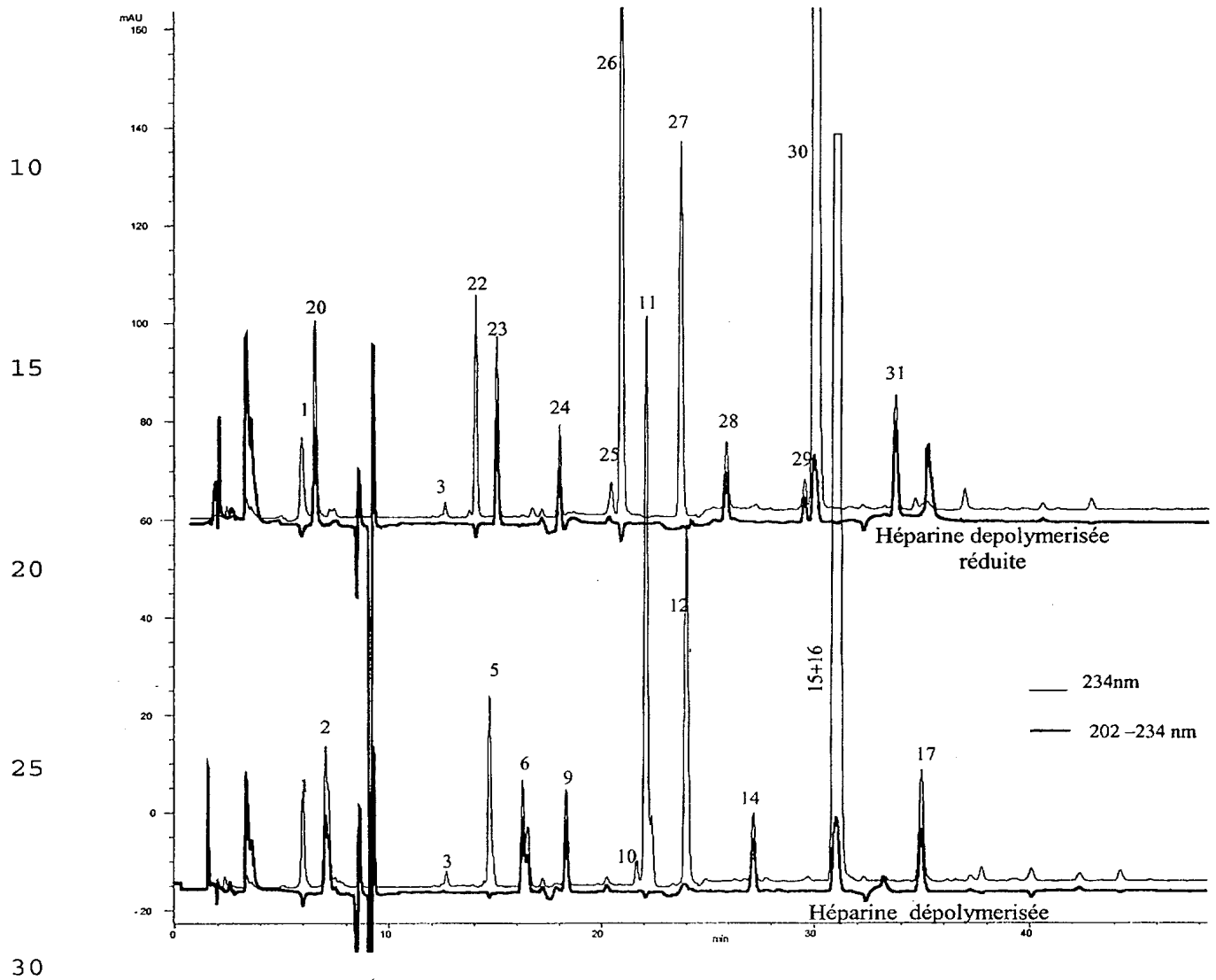
Séparation chromatographique de l'Enoxaparine dépolymérisée par les héparinases avant et après réduction par NaBH_4 (Signal en noir fin : UV à 234nm ; Signal en noir épais UV : 202 – 230nm)



18

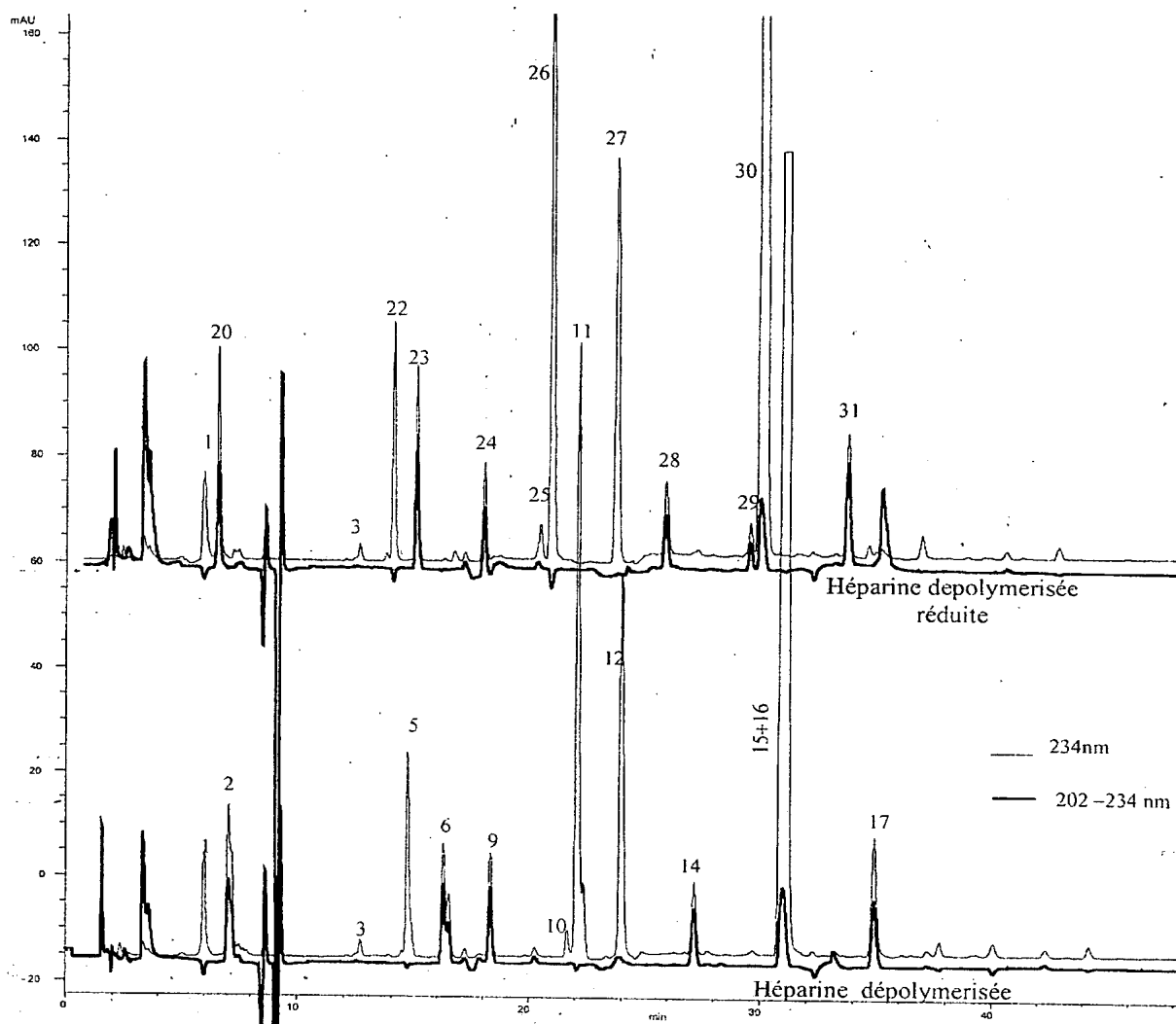
Figure 2 : Séparation chromatographique de l'héparine dépolymérisée par les héparinases avant et après réduction par NaBH_4 (Signal en noir fin : UV à 234nm ; Signal en noir épais : UV : 202 - 230nm)

5



35

Figure 2 : Séparation chromatographique de l'héparine dépolymérisée par les héparinases avant et après réduction par NaBH_4 (Signal en noir fin : UV à 234nm ; Signal en noir épais : UV : 202 – 230nm)



**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260699

Vos références pour ce dossier (facultatif)		FRAV2002/0026	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 11724	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
METHODE DE DETERMINATION DE GROUPEMENTS SPECIFIQUES CONSTITUANT LES HEPARINES OU LES HEPARINES DE BAS POIDS MOLECULAIRE			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
AVENTIS PHARMA S.A. 20 Avenue Raymond Aron 92160 ANTONY			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		MOURIER	
Prénoms		Pierre	
Adresse	Rue	1 rue Etienne Mehul	
	Code postal et ville	94220	CHARENTON LE PONT
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		VISKOV	
Prénoms		Christian	
Adresse	Rue	3 rue du Béarn	
	Code postal et ville	91130	RIS ORANGIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Antony, le 24 octobre 2002			
ROUSSEAU Pierrick			